



TITLE:

31P-Magnetic Resonance Spectroscopyによる尿路性器癌の放射線療法および化学療法の効果に関する実験的研究

AUTHOR(S):

蟹本, 雄右; 鈴木, 裕志; 岡田, 謙一郎

CITATION:

蟹本, 雄右 ...[et al]. 31P-Magnetic Resonance Spectroscopyによる尿路性器癌の放射線療法および化学療法の効果に関する実験的研究. 泌尿器科紀要 1994, 40(4): 295-301

ISSUE DATE:

1994-04

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/115251>

RIGHT:

³¹P-Magnetic Resonance Spectroscopy による 尿路性器癌の放射線療法および化学療法の 効果に関する実験的研究

福井医科大学泌尿器科学教室 (主任: 岡田謙一郎教授)

蟹本 雄右*, 鈴木 裕志, 岡田謙一郎

EXPERIMENTAL STUDIES ON EVALUATION OF THE EFFECTS OF RADIOTHERAPY AND CHEMOTHERAPY IN UROGENITAL TUMORS USING ³¹P-MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY

Yusuke Kanimoto, Yuji Suzuki and Kenichiro Okada

From the Department of Urology, Fukui Medical School

The effects of local irradiation and intraperitoneal injection of cisplatin (CDDP) and VP-16 were examined in the sequential ³¹P magnetic resonance spectroscopy (MRS) in testicular cancer (TC-1) and bladder tumor (BT-8) of human origin, serially transplanted in nude mice.

In the early phase of tumor growth, high-energy phosphate metabolites such as phosphocreatine (PCr), adenosine triphosphate (ATP) and phosphomonoester (PME) were detected in both grafted tumors. However, the relative value of inorganic phosphate (Pi) to PCr increased with the growth of the tumor.

Irradiation had the most pronounced effect to inhibit growth, followed by CDDP in both strains. However, growth inhibition was not observed in the VP-16 group. The effect of irradiation on the tumor histology was severely expressed in the nucleus and cytoplasm on the 4th to 7th day. The high PCr/Pi ratio during 2 to 14 days after irradiation suggested reoxygenation in the tumors with a high hypoxic cell fraction. In the CDDP and VP-16 groups, without histological change, the changes of PCr and Pi were milder than that in the irradiation group.

Thus the spectroscopic analysis is presumably expected to give us an earlier and more accurate information on the tumor than the conventional parameters.

(Acta Urol. Jpn. 40: 295-301, 1994)

Key words: ³¹P-MRS, Urogenital tumors, Radiotherapy, Chemotherapy, Nude mouse

緒 言

³¹P-MRS (magnetic resonance spectroscopy) は生体内の主要なエネルギー物質である PCr (phosphocreatinine) や ATP (adenosine triphosphate) などのリン酸化合物やその代謝産物を非侵襲性に測定することが可能であり生体組織の組成やエネルギー代謝の研究に広く用いられている。われわれもすでに精巣機能の実験的評価を中心に概要を発表した¹⁾。

悪性腫瘍についても、腫瘍の増殖とエネルギー代謝の関連や治療効果の非侵襲的評価法として、その有用

性が検討されている。各治療によるスペクトルの変化は in vivo での腫瘍の生物学的状態、すなわち血流の変化や細胞障害の程度などに深いかかわりを持つことが示唆されている²⁻⁶⁾。

今回、われわれはヌードマウス移植尿路性器腫瘍を用い、増殖にともなう MR スペクトルの変化、化学療法、放射線療法による変化を形態学的変化と比較して、その有用性を検討した。

実験材料および方法

1) 移植腫瘍

実験にはヌードマウスに継代されたヒト精巣腫瘍由来の TC-1 株およびヒト膀胱癌由来の BT-8 株を用

* 現在勤務先: 社会保険埼玉中央病院
〒336 埼玉県浦和市北浦和4-9-3

いた。腫瘍を無菌的に摘出し、細切後 2~3 mm 角を 5~7 週令の雄 (BALB/c) ノドマウス (nu/nu) の背部皮下に移植した。いずれの腫瘍も体積が $5 \times 10^2 \text{ mm}^3$ を越え、MRS による測定が可能となる 7 日目を原則として実験を開始した。実験を通じて 2~3 日毎に腫瘍径を測定し、Ovejera⁷⁾ の式を用いた腫瘍体積を算出した。

2) ³¹P-MRS

スペクトロスコピーは静磁場強度 2.0 T の実験動物用 MR 装置 (Phospho-enrgetics BEN 250/80: 大塚電子) で、直径 2.0 cm の表面コイルを使用した。繰り返し時間 2 秒で、原則として 600 回の FID (free induction decay) を平均してスペクトルをえた。えられたピークの中で高エネルギーリン酸化合物である PCr, α , β , γ -ATP, 低エネルギーリン酸化合物の Pi (inorganic phosphate) 細胞膜の磷脂質合成に関連する PME (phosphomonoester) の変化、およびリン酸代謝の面から腫瘍の虚血状態の指標として PCr/Pi 比を求め、これらの推移を検討した。

2) 化学療法、放射線療法

原則として移植後 7 日目に CDDP 10 mg/kg, VP-16 40 mg/kg を 1 回腹腔内投与した。放射線療法として腫瘍局所に 9 MeV の電子線 (NELAC 1018, NEC) 20 Gy を 1 回照射し、その後の腫瘍の増殖とスペクトル変化を検討した。また治療後 1, 4, 7, 12, 14 日目に腫瘍を摘出し、対照群と比較しながら腫

瘍の大きさ、および組織学的効果を検討した。

統計学的検定は Student t-test ならびに一元配置分散分析にて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとし、 $0.05 < P < 0.1$ を傾向として解析した。また測定値はすべて平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で表した。

結 果

1) 腫瘍サイズの変化

Fig. 1. は対照群 (N=10), CDDP 投与群 (N=5), VP-16 投与群 (N=5) および放射線照射群 (N=5) の腫瘍サイズの変化を TC-1 株, BT-8 株の 2 つの腫瘍について示したものである。TC-1 BT-8 のいずれも移植後 5~7 日より MRS による測定が可能となり、対照群ではその後約 2 週間増殖を続けた。2 つの移植腫瘍において CDDP 群は対照群に比較して軽度の増殖抑制効果が認められたが (TC-1: $0.05 < P < 0.1$, BT-8: $P < 0.05$), VP-16 群では明らかな効果は見られなかった。放射線照射群の増殖抑制効果は化学療法群よりすぐれ、TC-1, BT-8 のいずれも照射後約 2 週間では腫瘍増殖の有意の停滞が認められた (TC-1, BT-8: $P < 0.05$)。

2) スペクトルの変化

対照群におけるスペクトルの変化は、TC-1, BT-8 株のいずれでも悪性腫瘍に特徴的に検出される PME が全経過を通じて高いピークであった。増殖初期には小さなピークであった Pi は腫瘍の増殖とともに上昇

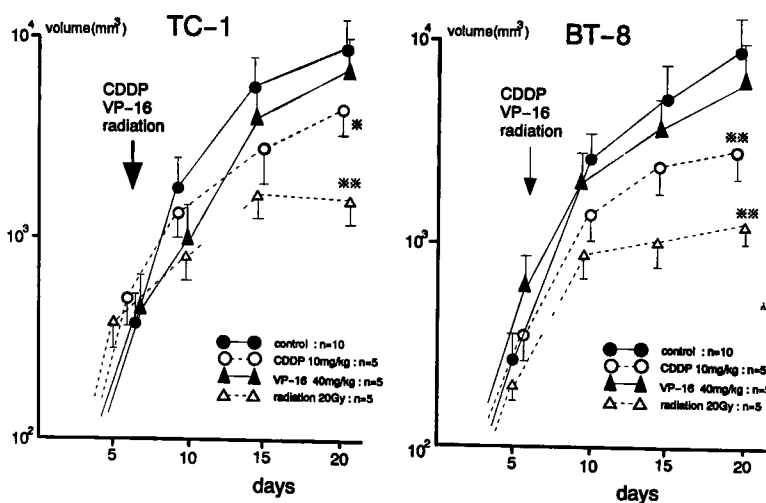


Fig. 1. Tumor volume changes of established TC-1 and BT-8 tumor implanted in nude mice. On day 7 of tumor growth, CDDP (10 mg/kg), VP-16 (40 mg/kg) was injected into the peritoneal cavity or X-irradiation (20Gy) given to the tumor. Values are means \pm SE. *: $0.05 < P < 0.1$, **: $P < 0.05$

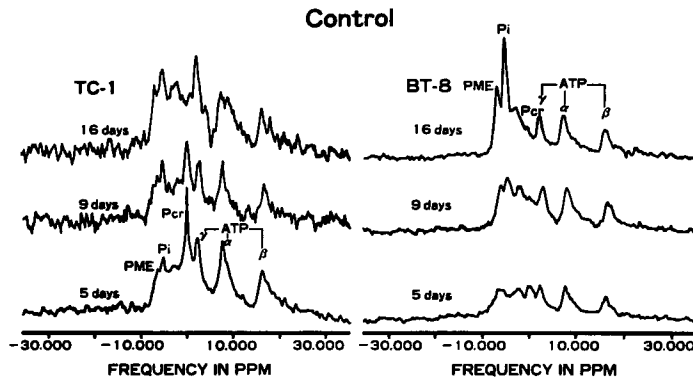


Fig. 2. Typical in vivo ^{31}P MRS spectra of untreated (control) TC-1 and BT-8 tumor at 5, 9 and 16 days after transplantation.

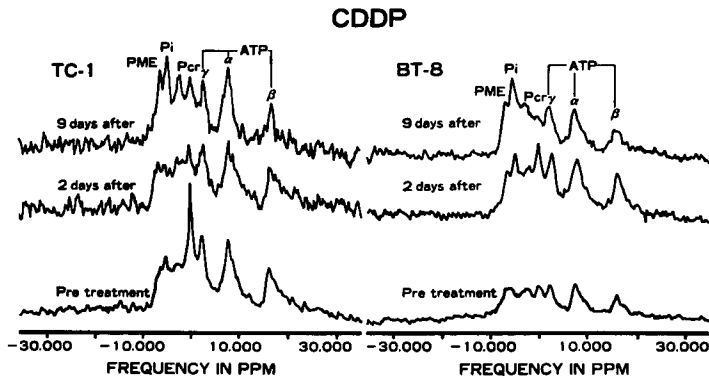


Fig. 3. Typical in vivo ^{31}P MRS spectra of TC-1 and BT-8 tumor treated by CDDP. Spectra were measured before, and 2 and 9 days after treatment.

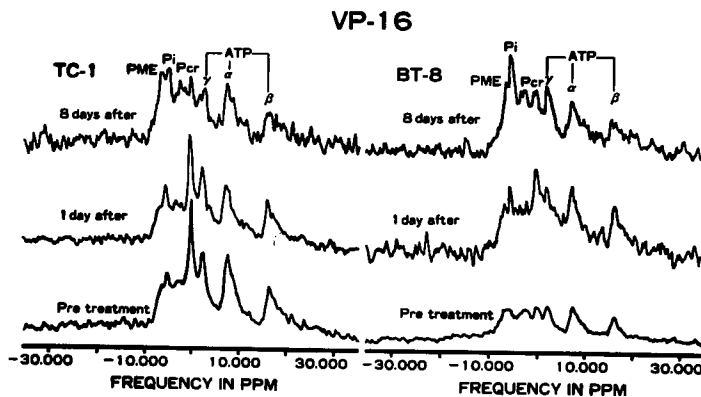


Fig. 4. Typical in vivo ^{31}P MRS spectra of TC-1 and BT-8 tumor treated by VP-16. Spectra were measured before, and 1 and 8 days after treatment.

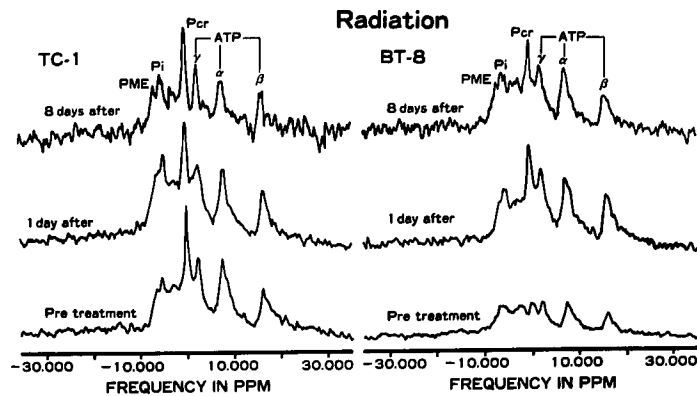


Fig. 5. Typical in vivo ^{31}P MRS spectra of TC-1 and BT-8 tumor treated with irradiation. Spectra were measured before, and 1 and 8 days after treatment.

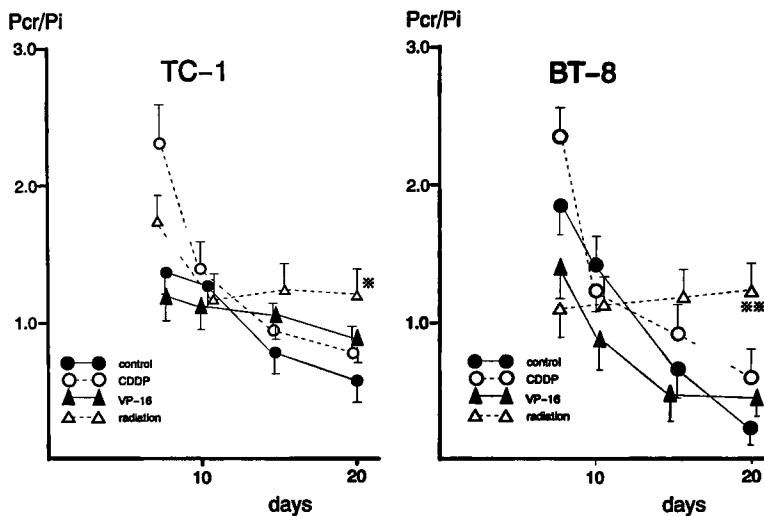


Fig. 6. Changes in the PCr/Pi ratios before and after treatment. Values are means \pm SE. ※: $0.05 < P < 0.1$, ※※: $P < 0.05$

傾向を示し、特に BT-8 株で顕著であった。PCr のピークは腫瘍の増殖につれて相対的に低下し、腫瘍内のリン酸代謝が好氣的状態から嫌氣的状態に変化したことが示された。また今回の実験ではいずれの ATP 分画も高いレベルで維持された (Fig. 2)。

CDDP 投与群は、TC-1 株では対照群とはほぼ同様の経過であったが、BT-8 株では Pi の上昇が明らかに抑制された。2つの移植腫瘍で、全般的に PCr, PME とも対照群に比較して高いピークを維持し、また Pi は腫瘍の増殖とともに高くなるものの、対照群ほど強い変化ではなかった (Fig. 3)。

VP-16 投与群では明らかな増殖抑制効果は認められず、スペクトル変化でも Pi の上昇は CDDP 投与群と同様に軽度であり、PCr の低下も対照群ほど強

いものではなかった (Fig. 4)。

放射線照射群は照射後24時間で PCr は高いピークを示し、Pi の上昇も軽度であった。また PME は放射線照射によって消失することなく、高いレベルを保っていた。これらの PCr, PME, ATP のピークは照射後7日目でも同様であり、対照群における増殖初期のパターンを約2週間継続した (Fig. 5)。

腫瘍組織における虚血状態を示す指標として用いた PCr/Pi 比は BT-8- TC-1 のいずれも対照群では経過とともに低下し、2～3週間 TC-1 で平均0.6に、BT-8 で平均0.2に低下した。しかし放射線照射群では観察期間を通じて平均1.0以上の値で推移し (TC-1: $0.05 < P < 0.1$, BT-8: $P < 0.05$)、腫瘍増殖抑制効果では放射線治療群に劣る結果であった CDDP, VP-

16 投与群でも有意差は認めないものの低下は対照群ほど強いものではなかった (Fig. 6).

α -ATP と PCr の位置を基準に Pi の化学シフトを計測して, Evanochko ら³⁾ の式から計算した腫瘍内 pH は, 対照群では腫瘍の増殖に伴い TC-1 で平均 0.6, BT-8 で 0.8 低下した. 治療群での pH の低下は対照群に比較して少ない傾向であったが, 個々のマウスの間のバラツキも大きく明らかな差は認められなかった.

3) 組織学的変化

放射線照射群における組織変化は正常分裂像の減少, 異常分裂像, 核の腫大, 核崩壊物, 細胞質内空胞, 細胞質腫大などがおもなもので, 大星・下里の判定基準⁸⁾ では細胞障害は認められるものの, 癌病巣パターンの破壊は認められない grade I に相当するものであった (Fig. 7). これらの変化は TC-1 では 24 時間から 4 日目を, BT-8 では 4 日から 7 日目を中心に腫瘍全体に認められた. しかし照射後 2 週間でこれらの変化は消失し, 増殖初期の細胞構築に復した (Table 1). CDDP, VP-16 群では, 対照群に比較して散在性に細胞質の腫大や空胞形成を認めるものの明らかな細胞障害を示す変化は観察されなかった.

考 察

移植腫瘍や臨床例を対象とした ^{31}P -MRS による検討は 1982 年の Ng らの報告²⁾ をはじめとしてさまざまな腫瘍において in vivo のスペクトル変化が報告されている. 腫瘍の増殖に伴う基本的変化は腫瘍の種類や担癌動物による差はなく, 増殖初期には好氣的解

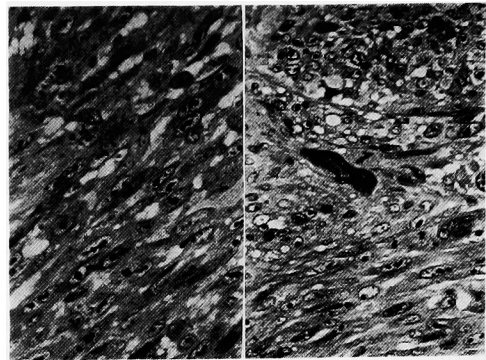


Fig. 7. (A): Histological section of TC-1 tumor 4 days after irradiation (20 Gy). Nuclear degeneration, swelling and vacuolation of cytoplasm were noted in the tumor cells. ($\times 400$ H.E. stain)
(B): Histological section of BT-8 tumor 7 days after irradiation (20 Gy). Vacuolation and swelling of cytoplasm were noted in the tumor cells. Giant cells were also observed. ($\times 400$ H.E. stain)

糖系により産生される ATP や PCr の高いピークと細胞膜におけるリン脂質代謝の亢進の指標となる PME のピークに特徴づけられる. しかし腫瘍の増殖に伴い, 相対的に腫瘍への血流が低下し嫌氣的解糖系が主体となるため, Pi の上昇と PCr, ATP が低下するとされている²⁾. 今回の検討で用いた TC-1, BT-8 株では検討期間中に ATP の明らかな低下は観察されなかったが, ともに明らかな Pi の上昇と PCr の低下を認めた. これらのスペクトルがどのように変化

Table 1. Micromorphology in the TC-1 and BT-8 tumors -response to irradiation-
TC-1

histological changes	pre	day 1	day 4	day 7	day 12	day 14
normal mitotic figures (/HPF)	3-5	1-3	1-3	3-5	5-8	5-10
abnormal mitotic figures (/HPF)	0	0-1	0-1	0-0.5	0-0.5	0-0.1
swelling of nuclei	—	+	+	±	±	—
nuclear degeneration	—	+	+	±	—	—
cytoplasmic vacuoles	—	—	+	—	—	—
swelling of cytoplasm	—	—	+	—	—	—

BT-8

histological changes	pre	day 1	day 4	day 7	day 12	day 14
normal mitotic figures (/HPF)	8-12	3-5	3-5	1-3	5-8	8-10
abnormal mitotic figures (/HPF)	0	0-1	0-1	0-1	0-1	0
swelling of nuclei	—	±	+	±	—	—
nuclear degeneration	—	—	+	+	—	—
cytoplasmic vacuoles	±	+	+	+	±	±
swelling of cytoplasm	—	—	—	+	—	—

するかにより治療効果を判定する時、有効例において変化は tumor activation (活性化) と tumor decline (抑制) に分けられる。すなわち高エネルギーリン化合物の ATP や PCr の増加と、低エネルギーリン化合物である Pi の低下を特徴とする活性化と、逆に Pi の増加と ATP, PCr の低下を示す抑制とである。個々の治療においても基本的にはこの2つの型のエネルギー代謝の変化と、それを反映する生理的な腫瘍環境の変化が起こっていると考えられる⁹⁾。温熱療法時に認められるスペクトルは有効例では腫瘍細胞のエネルギー代謝の強い抑制状態を示し、治療直後より著明な Pi の増高と PCr の低下を特徴とする変化が認められるとされている¹⁰⁾。

放射線療法では、今回のわれわれの検討では照射後24時間から2週間は Pi の上昇が停滞し、PCr の低下も軽度であった。これは放射線照射により、組織学的にも明らかなように核や細胞質に障害が起こり、腫瘍細胞が減少したことにより、相対的に残存する腫瘍細胞は好氣的状態となり、腫瘍細胞の再酸素化 (reoxygenation) が生じたためと思われ、この変化は Tozer ら¹¹⁾の報告とも良く一致するものであった。照射後数時間の変化では Pi の上昇、PCr の低下など腫瘍の抑制状態を示す報告があるものの²⁾、照射後24時間以降は tumor activation が変化の主体と考えられる。

化学療法におけるスペクトルの変化は放射線療法や温熱療法と異なり、いくつかの相反する結果が報告されている^{4,5)}。Steen⁹⁾は化学療法による変化をまとめた総説で、報告されたうち68%では tumor activation パターンを、32%では tumor decline パターンを示したとし、背景因子として実験動物、用いた腫瘍株、薬剤の種類や量、腫瘍サイズなど個々の因子を検討し、有効例でのスペクトル変化の違いは治療により死に至った腫瘍細胞と残存細胞の数、壊死細胞の局所からのクリアランス、さらに実験に用いた担癌動物の代謝面での反応の相違によるものと考案している。今回のわれわれの検討では CDDP でも VP-16 でも腫瘍の増殖抑制効果は少なく、組織学的評価では明らかな治療効果が観察されなかったにもかかわらず、治療後7日目、14日目のスペクトルでは Pi の増高の停滞と PCr の比較的高いピークを認め、tumor activation パターンとして観察された。今回の検討は CDDP, VP-16 とともに腹腔内への single dose therapy であり、本実験の結果をただちにヌードマウス移植腫瘍や臨床例における薬剤の有効性に結び付けることは困難である。しかし、³¹P-MRS は増殖抑制効

果や組織学的検討では評価できない腫瘍の細胞障害を鋭敏に検出しえるものと考えられた。

これらの実験植物を用いたスペクトルの変化は種々の悪性腫瘍で検討されているが、現在まで臨床例を対象にスペクトルの変化を検討した報告は少なく⁶⁾、報告例の多くは表在性の皮膚、軟部腫瘍や骨、脳腫瘍などの症例報告のため、深部悪性腫瘍における有用性を評価することは困難である。しかし超高磁場装置の開発や、より小さな表面コイル、体腔内のコイル設置などにより、泌尿器科領域において悪性腫瘍の診断と早期の非侵襲性の治療効果判定法としての応用が期待される。

結 語

- 1) ³¹P-MRS のスペクトルは、増殖初期では高いレベルの PCr, ATP, PME を認め、腫瘍の増殖に伴い PCr は低下し、Pi は増加した。
- 2) 検討した腫瘍では増殖抑制効果は放射線照射群が最もすぐれ、ついで CDDP 投与群であった。VP-16 投与群は明らかな発育抑制効果を認めなかった。
- 3) 放射線照射群では PCr が高く、Pi が低い増殖初期のパターンが照射後24時間から約2週間維持された。また組織学的変化は、正常分裂像の減少、核の腫大、細胞質内空胞の出現などがおもなもので、これらの変化は TC-1 株では4日目、BT-8 株では4～7日目を中心に腫瘍全体に認められた。
- 4) 明らかな増殖抑制効果や組織学的変化を認めなかった CDDP, VP-16 群ではスペクトルの変化は放射線照射群に比べて軽微であったが Pi の上昇、PCr/Pi 比の減少は対照群に比較して軽度であった。

以上の結果から、泌尿器科領域悪性腫瘍に対する³¹P-MRSによるスペクトル解析には磁場の強さ、コイルの大きさ、スペクトルの定量的解析など多くの問題があり、ただちに臨床レベルでの応用は困難である。しかし今後、機器・ソフトの開発により治療効果判定のより早期で鋭敏な非侵襲性の診断手段となる可能性が期待される。

稿を終るにあたり、組織学的検討に御協力いただいた白石泰三博士 (現：三重大学病理学第二講座助教授) に深く感謝いたします

なお本研究は文部省科学研究費03771034の助成を受け、研究成果は第78回日本泌尿器科学会総会、第28回日本癌治療学会総会において発表した。

文 献

- 1) Okada K, Suzuki Y, Kanimoto Y: An experimental study on evaluation of the

- bioactivity of testes and urogenital tumors ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. *Aktue Urologie* 21 (S-1): 71-73, 1990
- 2) Ng TC, Evanochko WT, Hiramoto RN, et al.: ^{31}P NMR spectroscopy in vivo tumors. *J Magn Reson* 49: 271-286, 1982
 - 3) Evanochko WT, Ng TC, Lilly MB, et al.: In vivo ^{31}P NMR study of the metabolism of murine mammary 16/C adenocarcinoma and its response to chemotherapy, x-radiation, and hyperthermia. *Proc Natl Acad Sci* 80: 334-338, 1983
 - 4) Naruse S, Hirakawa K, Horikawa Y, et al.: Measurements of in vivo ^{31}P nuclear magnetic resonance spectra in neuroectodermal tumors for the evaluation of the effect of chemotherapy. *Cancer Res* 45: 2429-2433, 1985
 - 5) Steen RC, Tamargo RJ, McGovern KA, et al.: In vivo ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy of subcutaneous 9L gliosarcoma: Effect of tumor growth and treatment with 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea on tumor bioenergetics and histology. *Cancer Res* 48: 676-681, 1988
 - 6) Sijens PE, Wijrdeman HK, Moerland MA, et al.: Human breast cancer in vivo H-1 and P-31 MR spectroscopy at 1.5T. *Radiology* 169: 615-620, 1988
 - 7) Ovejera AA and Houchens DP: Selection of potential anticancer agents using human tumor xenografts in athymic nude mice. *Contract NOI-CM-67099-NCI*.
 - 8) Shimozato Y, Oboshi S and Baba K: Histological evaluation of effects of radiotherapy and chemotherapy for carcinoma. *Jpn J Oncol* 1: 19-35, 1971
 - 9) Steen RG: Response of solid tumors to chemotherapy monitored by in vivo ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy: A review. *Cancer Res* 49: 4075-4085, 1989
 - 10) Lilly MB, Ng TC, Evanochko WT, et al.: Loss of high-energy phosphate following hyperthermia demonstrated by in vivo ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 44: 633-638, 1984
 - 11) Tozer GM, Ghujwalla ZM, Griffiths JR, et al.: Phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and blood perfusion of the RIF-1 tumor following x-irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 155-164, 1989

(Received on June 8, 1993)
(Accepted on November 23, 1993)